

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 OCT. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

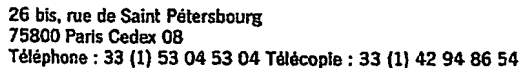
SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

Best Available Copy

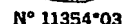


<p>Remise des pièces DATE 18 OCT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0213022 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 18 OCT. 2002</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS</p>	
<p>Vos références pour ce dossier (facultatif) CPIAC 60.806-1653</p>			
<p>Confirmation d'un dépôt par télécopie</p>		<p><input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie</p>	
<p>2 NATURE DE LA DEMANDE</p>		<p>Cochez l'une des 4 cases suivantes</p>	
<p>Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/></p>			
<p>Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/></p>			
<p>Demande divisionnaire <input type="checkbox"/></p>			
<p>Demande de brevet initiale N° _____ Date _____</p>			
<p>ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____</p>			
<p>Transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/></p>			
<p>Demande de brevet initiale N° _____ Date _____</p>			
<p>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p>CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES</p>			
<p>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>		<p>Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>	
<p>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique</p>	
<p>Nom ou dénomination sociale</p>		<p>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)</p>	
<p>Prénoms</p>			
<p>Forme juridique</p>		<p>Etablissement Public</p>	
<p>N° SIREN</p>		<p>_____</p>	
<p>Code APE-NAF</p>		<p>_____</p>	
<p>Domicile ou siège</p>	<p>Rue</p>	<p>3, rue Michel-Ange</p>	
	<p>Code postal et ville</p>	<p>75116 PARIS CEDEX 16</p>	
	<p>Pays</p>	<p>FRANCE</p>	
<p>Nationalité</p>		<p>Française</p>	
<p>N° de téléphone (facultatif)</p>		<p>N° de télécopie (facultatif)</p>	
<p>Adresse électronique (facultatif)</p>			
<p><input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>			

REMISE DES PIÈCES DATE 18 OCT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0213022 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 210502
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom PEAUCELLE Prénom Chantal Cabinet ou Société Cabinet ARMENGAUD AINE N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel 92-1189 Adresse Rue 3, Avenue Bugeaud Code postal et ville 75116 PARIS Pays FRANCE N° de téléphone (facultatif) 01-45-53-05-50 N° de télécopie (facultatif) 01-45-53-80-21 Adresse électronique (facultatif) armengau@club-internet.fr		7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES Réduction pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première-fois-pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes : 1	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI MME BLANCANEUX	



Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

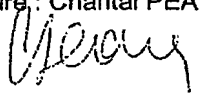

Page suite N° 1.../1...



REMISE DES PIÈCES
DATE 18 OCT 2002
LIEU 75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT 0213022
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 G W / 010702

Vos références pour ce dossier (<i>facultatif</i>)		CP/AC 60.806-1653	
DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE		Pays ou organisation	
		Date	<input type="text"/>
		Pays ou organisation	
		Date	<input type="text"/>
		Pays ou organisation	
		Date	<input type="text"/>
		Pays ou organisation	
		Date	<input type="text"/>
DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale	UNIVERSITE VICTOR SEGALEN		
Prénoms			
Forme juridique	Etablissement Public		
N° SIREN	<input type="text"/>		
Code APE-NAF	<input type="text"/>		
Domicile ou siège	Rue	146, rue Léo-Saignat	
	Code postal et ville	[3] [3] [0] [7] [6] BORDEAUX	
	Pays	FRANCE	
Nationalité	Française		
N° de téléphone (<i>facultatif</i>)			
N° de télécopie (<i>facultatif</i>)			
Adresse électronique (<i>facultatif</i>)			
DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale	UNIVERSITE DE POITIERS		
Prénoms			
Forme juridique	Etablissement Public		
N° SIREN	<input type="text"/>		
Code APE-NAF	<input type="text"/>		
Domicile ou siège	Rue	Hôtel Pinet 15 rue de l'Hôtel Dieu	
	Code postal et ville	[8] [6] [0] [3] [4] POITIERS CEDEX	
	Pays	FRANCE	
Nationalité	Française		
N° de téléphone (<i>facultatif</i>)			
N° de télécopie (<i>facultatif</i>)			
Adresse électronique (<i>facultatif</i>)			
SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Mandataire : Chantal PEAUCELLE 	
		VISA DE LA PREFECTURE OU DE L'INPI  MME BLANCANEUX	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INP.

Criblage de molécules à activité anti-prion :
kits, méthodes et molécules criblées.

La présente invention se rapporte à du criblage de molécules à
5 activité anti-prion. Elle vise plus particulièrement des kits
de criblage de molécules à activité anti-prion, les méthodes
de criblage, et une famille de molécules à activité anti-prion
mise en évidence à l'aide du crible selon l'invention.

10 Les prions sont des protéines infectieuses responsables chez
les mammifères de certaines maladies neuro-dégénératives de
type encéphalopathies spongiformes comme la maladie de
Creutzfeldt-Jakob chez l'homme ou encore les maladies dites
15 « de la vache folle » chez les bovins ou « tremblante du
mouton » chez les ovins. Ces différentes maladies sont
provoquées par des agents infectieux non conventionnels : à la
différence des agents infectieux traditionnels (bactéries,
virus par exemple), ils ne contiennent pas d'acides
nucléiques. Le Professeur Stanley Prusiner a formulé
20 l'hypothèse de « la protéine seule », selon laquelle l'agent
infectieux ne serait constitué que d'une protéine. Cette
protéine existe naturellement dans les cellules sous une forme
« normale » (ou PrP^{C}), c'est-à-dire soluble, essentiellement
sous forme d'hélice α et non agrégée donc fonctionnelle. Dans
25 certaines conditions encore inconnues, cette protéine peut se
transformer en une forme prion (ou PrP^{Sc}). Sous cette forme
prion, la protéine forme des agrégats insolubles,
essentiellement sous forme de feuillets β . Le caractère
infectieux de cette conformation prion PrP^{Sc} viendrait du fait
30 que, outre les caractéristiques indiquées précédemment, la
protéine sous forme prion gagne également la capacité à
catalyser le passage de la forme cellulaire normale PrP^{C} vers
la forme prion PrP^{Sc} dans un mécanisme de type « boule de
neige ».

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* contient plusieurs protéines se comportant comme des prions (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dès les années soixante, deux mécanismes génétiques non conventionnels y sont décrits. En 1994, les phénotypes correspondants [PSI+] et [URE3] ont été proposés comme résultant de l'inactivation auto-catalytique des protéines Sup35p et Ure2p respectivement. Ces protéines prions présentent donc a priori une analogie mécanistique avec les systèmes mammifères délétères pour la santé publique. A l'instar de la protéine PrP, la protéine Sup35p « normale » passe d'un état soluble à un état insoluble et agrégé dès que la protéine est en contact avec une autre protéine Sup35p sous la forme prion. Cet état agrégé est vérifié tant par des expériences de centrifugation que par des expériences de localisation intracellulaire. Les prions de la levure peuvent être éliminés (« curés ») par une forte dose (3 à 5 mM) de chlorure de guanidium. Suite à un tel traitement (qui doit être appliqué sur au moins six à dix générations), les agrégats protéiques générés par la présence des prions disparaissent et la protéine en question (Sup35p, par exemple) se retrouve sous une forme normale, soluble, fonctionnelle mais ayant conservé la susceptibilité d'être convertie sous une forme prion si elle se retrouvait à nouveau en contact avec une autre protéine Sup35p dans un tel état.

La protéine Sup35p, en complexe hétérodimérique avec la protéine Sup45p, forme un facteur de terminaison de la traduction. Ce facteur reconnaît les codons stop opales (UGA). Sous sa forme cellulaire normale (soluble et active) dans les souches [psi-], Sup35p, en association avec Sup45p termine efficacement la traduction au niveau de ces codons opales. Dans une souche [PSI+] où la protéine Sup35p est sous forme prion, elle est majoritairement présente sous forme d'agrégats

insolubles. Ne pouvant pas se lier à Sup45p, elle est ainsi non fonctionnelle dans la terminaison de la traduction. Une petite fraction de l'ensemble des protéines Sup35p cellulaire reste toutefois soluble dans ces cellules [PSI+] où elle permet, en complexe avec Sup45p, d'assurer un « service minimum » de terminaison de la traduction, service essentiel à la survie de la levure. Un système colorimétrique permettant de détecter, de façon indirecte, la forme sous laquelle la protéine Sup35p est présente : normale ou prion, a été élaboré à partir de ces constatations. Ce système, décrit depuis longtemps (voir l'article de synthèse par Fernandez-Bellot et Cullin, 2001), est basé sur l'utilisation de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine : la SAICAR synthétase. Cette enzyme catalyse la formation de 4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole ribonucléotide (SAICAR) à partir de 4-carboxy-5-aminoimidazole ribonucléotide (CAIR). L'allèle *ade1-14* contient un codon opale dans le cadre de lecture du gène *ADE1*. Dans une souche [psi-], Sup35p en association avec Sup45p va donc arrêter la traduction du gène *ADE1* au niveau de ce codon stop. La protéine *ade1-14p* ainsi traduite sera tronquée et donc non fonctionnelle. En conséquence les substrats en amont de l'enzyme Adelp vont s'accumuler, notamment la 5-aminoimidazole ribonucléotide (AIR). L'AIR étant oxydé en un composé de couleur rouge, les colonies formées par les cellules [psi-] seront de couleur rouge. En outre, ces cellules seront auxotrophes pour l'adénine. A l'inverse, dans une souche [PSI+], la protéine Sup35p est essentiellement présente sous forme d'agrégats donc incapable de s'associer avec Sup45p pour stopper la traduction au niveau du codon opale de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*. En conséquence, les ribosomes vont faire une pause au niveau de ce codon stop avant de reprendre leur activité de traduction (translecture). Une certaine quantité de protéine Adelp fonctionnelle sera donc synthétisée, les

cellules seront autotrophes pour l'adénine et formeront des colonies de couleur blanche à rosée.

5 Dans un article paru dans P.N.A.S, l'équipe du Pr. Stanley Prusiner divulgue un test de détection de molécules à activité anti-prion (Korth et al., 2001). Ce test est effectué sur un modèle de mammifères (neuroblastomes murins infectés par PrP^{sc}). Les conditions de sécurité (laboratoire P3) et de cultures cellulaires (manipulations assez lourdes) ne
10 permettent pas de réaliser du criblage à haut débit.

La demande WO 98/30909 décrit également un procédé de criblage de molécules à activité anti-prion réalisé sur des rongeurs infectés par un agent transmissible non conventionnel. Cette
15 méthode de criblage présente les mêmes limites que la méthode décrite dans P.N.A.S.

Les travaux des inventeurs les ont amenés à réaliser un système de criblage haut débit pour mettre en évidence des
20 molécules possédant une activité anti-prion, basé sur le système rapporteur colorimétrique de la protéine Sup35p, décrit ci-dessus.

La présente invention est donc relative à un ~~kit~~ de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il
25 comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.

Bien que basé sur les prions des levures, le kit selon
30 l'invention permet d'isoler des molécules actives contre les prions de mammifères. L'exemple 7 suivant montre que les molécules les plus actives isolées par le Pr. Prusiner présentent également une activité dans le crible selon l'invention.

Pourtant, on observe de nombreuses différences entre les prions de levure et les prions de mammifères. Dans un article de la revue « Cellular and Molecular Life Sciences », le Professeur C.Cullin propose même au vu de ces différences de distinguer les prions de levures de ceux des mammifères en employant le terme de « propagons ». Comme différences notables entre les « prions » (mammifères) et les « propagons » (levure), on peut citer le caractère cytoplasmique des propagons alors que le prion PrP des mammifères est une protéine ancrée à la membrane plasmique, le caractère pathologique des prions de mammifères, ainsi qu'un certain nombre de différences biophysiques (structure ternaire et quaternaire, réversibilité du curage...)

15

L'un des principaux avantages d'un tel crible réside dans sa parfaite innocuité ce qui permet de le réaliser dans un laboratoire de biologie moléculaire classique de niveau L2, et non, comme requis dans les techniques antérieures, dans un laboratoire de niveau P3.

20

De plus, la grande facilité d'utilisation et le très faible coût de ce kit rend le criblage à haut débit réalisable.

----- L'utilisation de l'antibiogramme permet en outre de tester en une seule expérience un gradient de concentration, contrairement aux tests classiques, dans lesquels seule une concentration est testée. Pour chaque molécule dont on teste l'activité anti-prion, l'utilisation de l'antibiogramme permet également d'avoir des informations sur la toxicité du produit ainsi que sur le rapport activité/concentration, et de déterminer ainsi la meilleure concentration efficace.

25

30

Selon un mode de réalisation préféré, la souche [PSI+] utilisée dans le kit selon l'invention porte une inactivation du gène *ERG6*.

5 En effet, les levures sont naturellement assez peu perméables. En particulier, la levure préférée pour la mise en œuvre de l'invention, *Saccharomyces cerevisiae*, présente une imperméabilité telle que la réalisation d'un criblage s'avère particulièrement peu efficace sans cette inactivation.

10

La méthode d'analyse du crible selon l'invention est visuelle. Selon l'activité anti-prion de la molécule testée, les colonies de cellules auront une coloration rouge, rosée ou blanche. Le choix de la souche de levure peut permettre
 15 d'améliorer le contraste entre les colonies. En effet, certaines souches dites « Strong » facilitent l'analyse visuelle du crible. De telles souches possèdent un fort niveau d'agrégation des formes prions. A contrario, la souche sera dite « Weak ». Les souches préférées pour la mise en œuvre de
 20 l'invention sont donc les souches de type « Strong ».

D'autres levures peuvent également être utilisées. On citera à titre d'exemples : *Kluyveromyces lactis*, *Pichia methanolica*,
 — *Saccharomyces ludwigii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia*
 25 *pastoris*, *Zygosaccharomyces rouxi*, *Schizosaccharomyces pombe*.

Etant donné la létalité synthétique observée entre l'inactivation du gène *ERG6* et l'inactivation du gène *TRP1*, le gène *ERG6* pourra être délété en utilisant le gène *TRP1* comme
 30 marqueur de délétion.

Avantageusement, le kit comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.

Par curage, on entend une élimination des formes prions dans les cellules de levure. Cette élimination peut être temporaire ou définitive.

- 5 A titre d'exemple, un agent de curage pour le prion peut être l'eau oxygénée ou préférentiellement, le chlorure de guanidium.

- 10 Par doses sub-efficaces, on entend des doses qui utilisées seules ne suffiraient pas à curer les prions des levures. Les valeurs de telles doses sont données, dans les exemples qui suivent, pour le chlorure de guanidium.

- 15 Les intérêts de la présence d'un agent de curage à des doses sub-efficaces sont de renforcer la sensibilité du crible et d'obtenir un meilleur contraste.

- 20 Le kit selon l'invention peut être mis en œuvre dans une méthode de criblage de molécules à activité anti-prion. Cette méthode de criblage, également visée par l'invention, est caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :

- 25 a. réalisation d'un tapis de cellules *in vitro*
b. dépôt des composés à tester selon la méthode de l'antibiogramme,
c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.

- 30 Cette méthode possède des avantages analogues à ceux du kit selon l'invention. Il s'agit d'un test visuel, très facile à analyser. Sa mise en œuvre est très simple et peu onéreuse. Les précautions relatives à la sécurité sont celles d'un laboratoire classique de biologie moléculaire. Elle permet le

criblage massif : une personne seule peut cribler manuellement plus de 400 produits par jour. Un criblage de très haut débit serait possible par automatisation de la méthode. Le résultat du crible est révélé au bout de 7 jours, sans qu'il soit
 5 nécessaire de recourir à des manipulations lourdes entre le jour J et le jour J+7 (éventuellement un changement de température de l'incubateur). Enfin, cette méthode est particulièrement économique.

10 Selon un mode de réalisation préféré, la méthode de criblage selon l'invention est caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé. Une des levures préférées pour la mise en œuvre de cette méthode est *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Avantageusement, l'étape a. de la méthode de criblage comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

La méthode peut également comporter les étapes suivantes :

- 20 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C, et/ou,
 f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

L'incubation à 2-6°C permet d'accentuer ~~le~~ le contraste des
 25 colorations des colonies.

Préférentiellement, le test de criblage secondaire pourra comporter les étapes suivantes :

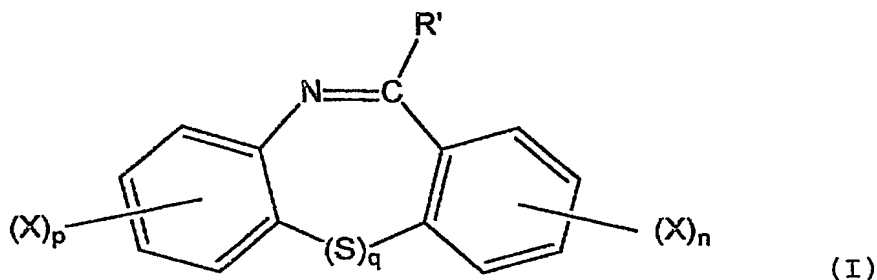
- 30 - construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
 - réalisation des étapes a. à e. de la méthode de criblage selon l'invention, l'étape a. comportant en

outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

Un tel crible secondaire permet de tester très rapidement si
 5 les molécules isolées lors du crible primaire peuvent avoir un
 effet général sur les prions chez la levure. En effet, les
 gènes *SUP35* (responsable du prion [*PSI+*]) et *URE2* (responsable
 du prion [*URE3*]) codent pour des enzymes ayant des fonctions
 totalement différentes et dont les séquences primaires sont
 10 très éloignées.

L'invention couvre également les molécules isolées par la
 méthode de criblage selon l'invention.

15 En particulier, la méthode de criblage a permis d'isoler des
 agents anti-prion ayant la formule (I) suivante :



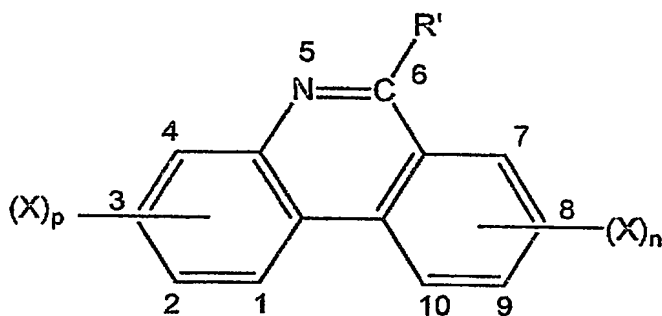
20 dans laquelle R^1 est un groupement H, NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une
 chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10
 carbones, ramifiée ou non,

X représente F, Cl, Br, I, CF_3 , SR^3 , OR^3 , OH, NO_2 ,
 COR^3 , $CONH_2$, COOH, $COOR^3$, où R^3 est un groupement
 25 alkyl de 1 à 4 carbones, de préférence CH_3 .

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou
 2,

q égale 0 ou 1.

Elle vise plus particulièrement les agents anti-prion de formule (II) :

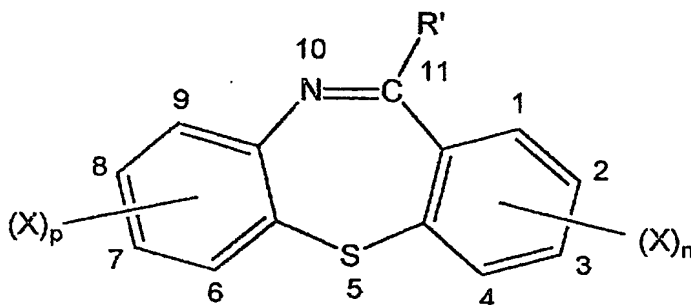


(II)

dans laquelle R^1 représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,
 X représente F , Cl ,
 p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

Certains composés de cette famille sont particulièrement actifs. Il s'agit de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine, ainsi que de leurs dérivés chlorés, en particulier lorsque le chlore est placé en position 8, 9, 10, de préférence, en position 10 (voir dans les exemples qui suivent).

L'invention couvre en particulier les agents anti-prion de formule (III):



(III)

dans laquelle R^1 représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-$
 $N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F , Cl ,

p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou

2.

5

Cette famille de molécules, appelée « Kastellpaolitines » par les inventeurs, possède à un degré plus ou moins fort l'activité anti-prion recherchée. En particulier, les dérivés chlorés de cette famille sont particulièrement efficaces. Les
 10 meilleures efficacités sont obtenues lorsque le chlore est placé en position 2, 3, 4, de préférence, en position 4 (voir KP1 dans les exemples qui suivent).

15 Les agents anti-prion selon l'invention sont particulièrement utiles pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir et/ou à traiter les maladies neurodégénératives, en particulier de type à agrégation de protéines, telle que les encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer et de
 20 Hungtinton... Ces médicaments peuvent être à visée humaine ou vétérinaire, en particulier pour des animaux domestiques (vaches, moutons, ...) ou sauvages (lynx, cervidés tels que biches, élans, ...)

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples ci-dessous et en se référant aux figures suivantes:

- la figure 1 se rapporte à la faisabilité du crible,
- la figure 2 illustre le protocole de criblage,
- 30 - la figure 3 est relative à l'isolement des Kastellpaolitines, de la phénanthridine et à leur relation structure/activité,
- la figure 4 se rapporte à la détermination de l'activité de la 6-aminophénanthridine,

- la figure 5 présente les résultats des tests de cure liquide,
- la figure 6 se rapporte au crible secondaire basé sur le prion [URE3], et,
- 5 - la figure 7 démontre la validation du test avec la chlorpromazine et la quinacrine.

Exemple 1 : Réalisation du crible.

10 1. Matériel et méthodes

Organismes (*Saccharomyces cerevisiae*) et milieux de culture

La souche de levure haploïde [PSI+] 74-D694 (Mat a, adel-14, trp1-289, his3-4200, ura3-52, leu2-3,112) a été utilisée dans
 15 la mise au point de la méthode de criblage. La souche utilisée est dite « Strong » car elle présente un phénotype bien marqué lorsque le facteur de terminaison de la traduction Sup35p est sous une forme prion ou agrégée.

20 Afin d'augmenter la pénétration des inhibiteurs, les inventeurs ont modifié génétiquement cette souche en y introduisant une mutation du gène *ERG6*. Ce gène intervient dans la biosynthèse de l'ergostérol, composant de la paroi cellulaire des levures. La mutation a été réalisée par
 25 insertion au niveau du site chromosomique du gène *ERG6* d'une « cassette de délétion » correspondant au gène marqueur *TRP1* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *ERG6*. Cette cassette a été produite par PCR en utilisant le plasmide pFA6a-kanMX6 comme
 30 matrice et les oligonucléotides oBM1060 (5') et oBM1061 (3') comme amorces. Les cellules de levure 74-D694 « Strong » ayant intégré la cassette de délétion (souche appelée STRg6, déposée à la CNCM le 10 octobre 2002 sous le numéro I-2943) sont celles qui se développent sur milieux minimum dépourvu en

tryptophane. La mutation $\Delta erg6::TRP1$ a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche STRg6 comme matrice et les oligonucléotides oBM1030 (5') et oBM1063 (3') comme amorces.

5

Les amorces PCR utilisées présentent les séquences en nucléotides suivantes :

oBM1060 5' CGATTTAAGTTTTACATAATTTAAAAACAAGAATAAATAATATAG
TAGGCAGCATAAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3' (SEQ ID N°1)

10 oBM1061 5' CTGCATATATAGGAAAATAGGTATATATCGTGCCTTTATTGAATCTTAT
TGATCTAGTGAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3' (SEQ ID N°2)

oBM1030 5' GGTACCTCGTTCCCGTAC 3' (SEQ ID N°3)

oBM1063 5' CAGTCAGAAATCGAGTTCCA 3' (SEQ ID N°4)

15 Sauf indication du contraire, les souches de levure sont cultivées à 30°C dans du milieu riche (YPD ψ) ou dans du milieu minimum. Lorsque ce n'est pas explicitement spécifié, les pourcentages correspondent à un rapport masse/volume. La forme gélosée est obtenue par ajout d'agar à 2%.

20 YPD ψ : 1% d'extrait de levure (FISHER®), 2% de peptone (GIBCO®) et 2% de glucose ;

Milieu minimum : 0,175% de yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate (DIFCO®), 0,75% de sulfate d'ammonium et 2% de glucose. Ce milieu est amené à pH 6. Afin de

25 compenser les éventuelles auxotrophies, ce milieu peut être complété, après stérilisation, par ajout d'acides aminés (0,002% de L-Histidine et/ou 0,004% de L-Leucine et/ou 0,003% de L-Tryptophane) ou de bases azotées (0,0025% d'Uracile et/ou 0,008% d'Adénine).

30

Méthode de criblage de substances à activité anti-prionesque (« Prion Halo Assay »)

La méthode de criblage élaborée est basée sur le principe de l'antibiogramme. En effet, les composés à tester sont déposés

sur un disque en papier filtre stérile, lui-même déposé sur une boîte de milieu YPD ψ solide contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium préalablement ensemencée avec environ 10^6 cellules de la souche *STRg6* afin de réaliser un tapis de levure.

5 L'ajout d'une faible quantité de chlorure de guanidium (0,2 mM), dose sub-efficace pour curer les prions chez la levure (la dose efficace étant de l'ordre de 3 à 5 mM) permet d'augmenter la sensibilité du test (voir la partie Résultats). Les boîtes carrées de 12 cm de côté sont ensuite incubées 3

10 jours à 23,5°C pour permettre l'apparition et la croissance des colonies de levures. Ces boîtes sont ensuite stockées 3 jours à 4°C afin d'accentuer la coloration rouge présente autour des disques imbibés de substances actives sur la forme prion de la protéine Sup35p. La comparaison avec les témoins

15 négatifs (dépôt du solvant des inhibiteurs testés) et positif (dépôt d'une solution de chlorure de guanidium à 300 mM, provoquant une élimination efficace des protéines Sup35p sous une forme prion) permet de juger de l'efficacité d'un composé. La figure 2 illustre le protocole de la méthode de criblage :

20 (1) Culture de la souche *STRg6* ; (2) Dépôt et étalement avec des billes de verre stériles de 3 & 4 mm de diamètre, d'environ 10^6 cellules en phase exponentielle de croissance sur une boîte de milieu solide YPD ψ contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium—:—constitution du "tapis" de cellules ; (3)

25 Dépôt des disques de papier filtre stériles selon un quadrillage permettant l'analyse de 32 composés (témoins inclus) et dépôt de 20 μ l maximum de chacun des produits à tester ; (4) Incubation ; (5) Numérisation du résultat obtenu ; (6) Exemple présentant l'isolement d'un composé

30 présentant une forte activité anti-prion.

Synthèse de 11-aminodibenzo[b,f] [1,4] thiazépines et de la 6-aminophénanthridine

Les 11-aminodibenzo[b,f] [1,4]thiazépines, appelés encore Kastellpaolitines, peuvent être préparés en une seule étape.

- 5 La synthèse de ces produits a déjà été décrite dans la publication de Mettey et al., 1997.

2. Résultats

10

Principe et faisabilité du crible

- Le chlorure de guanidium, le seul produit connu pour curer efficacement les prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a servi non seulement de témoin positif tout au long du criblage, mais aussi pour étudier la faisabilité de la méthode ainsi que pour la mettre au point. Le chlorure de guanidium cure efficacement les différents prions de levure à une dose comprise entre 3 et 5 mM (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dans ces conditions, la cure nécessite une présence constante de ce produit pendant six à dix générations en phase exponentielle de croissance compromettant la faisabilité du crible sur boîte tel que les inventeurs souhaitaient le réaliser.

- 25 La figure 1 montre la faisabilité du crible.

- Les trois panneaux de gauche : une souche [PSI+] est cultivée pendant 48H en présence de chlorure de guanidium à 5 mM (avec 0,2% DMSO final) ou, comme contrôle avec seulement 0,2% DMSO final. A T = 0, puis toutes les 24H, une goutte de 10 µL (environ 10⁴ cellules) est déposée sur une boîte de milieu riche. La cure au chlorure de guanidium commence à avoir un effet après 24H de traitement, soit après 6 générations environ (une coloration rosée commence à apparaître). Au bout de 48H, soit après 12 générations environ, la goutte de

cellules présente une coloration nettement rouge, signe d'une cure complète des cellules [PSI+].

Le panneau du milieu : quelques cellules sont prélevées à T = 48H et sont striées sur un milieu frais. Elles forment presque toutes des colonies rouges dans le cas de la cure au chlorure de guanidium.

Le panneau de droite : ces même cellules sont culottées au fond d'un tube Eppendorf après culture liquide. Dans le cas de la cure au chlorure de guanidium, elles forment un culot rouge.

La première étape a donc consisté à déterminer si le chlorure de guanidium pouvait avoir un effet visualisable sur boîte sur des cellules [PSI+] avec le système de pastilles à antibiogramme. Une fois cette étape réalisée, les inventeurs ont mis au point les conditions optimales de température, de milieu, de densité ainsi que de type cellulaire à utiliser (figure 2). La souche présentant la meilleure sensibilité est la souche STRg6 cultivée à 23,5 °C et en présence de 200 µM de chlorure de guanidium. En effet, l'introduction d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium dans le milieu permet d'augmenter la sensibilité du test.

-----Criblage d'une chimiothèque-----

Des composés (environ 1000) ont été passés au crible en utilisant les conditions optimisées par les inventeurs (figure 2). Sur chaque boîte, 15 µl de DMSO sont déposés sur le filtre en haut à gauche (témoin négatif) et 15 µl d'une solution de chlorure de guanidium en solution à 300 mM dans le DMSO (témoin positif) sont déposés sur le filtre en bas à droite. Le même volume (15 µl) de chacun des produits de la banque (tous en solution à 10 mM dans le DMSO) est déposé sur les filtres restants (trente par grande boîte de Pétri carrée). Un signal positif (visualisation d'un halo rouge autour du disque

de papier filtre stérile sur lequel le produit est déposé) a été obtenu pour cinq produits. Ces produits correspondent à quatre molécules d'une même famille, appelées « Kastellpaolitines » par les inventeurs, et à une cinquième bien connue : la phénanthridine.

Exemple 2 : Identification des Kastellpaolitines et de la phénanthridine.

Les structures chimiques des Kastellpaolitines et de la phénanthridine sont présentées dans la figure 3B. Le panneau 3A montre une analyse comparative de la taille des halos rouges obtenus respectivement avec l'ensemble de ces molécules (toutes déposées en quantité équivalentes : 15 µl d'une solution à 10 mM dans le DMSO). Cette expérience permet de comparer l'activité relative de chacun de ces produits. Le plus actif est la Kastellpaolitine 1 (ou KP1) suivi par la phénanthridine.

Synthèse et test de la 6-aminophénanthridine

Une analyse comparative de la phénanthridine d'une part, et des Kastellpaolitines d'autre part montre plusieurs points communs entre ces deux groupes de molécules (figure 3). Les différentes molécules y sont classées de la moins active à la plus active et leurs formules respectives indiquées. Toutes sont tri-cycliques, le cycle central contenant dans tous les cas un azote en double liaison avec un carbone adjacent. Par contre, chez toutes les Kastellpaolitines, le carbone du cycle central qui est en double liaison avec cette azote porte un groupement amino, ce qui n'est pas le cas pour la phénanthridine. Cette observation a conduit les inventeurs à vouloir tester la 6-aminophénanthridine.

La 6-aminophénanthridine peut être préparé selon le mode opératoire mis au point par Kessar et al, 1969.

La 6-aminophénanthridine a donc été passée au crible selon l'invention, en comparaison avec les Kastellpaolitines 1 (KP1) et 5 (KP5) ainsi qu'avec la phénanthridine. Le résultat est très net : la 6-aminophénanthridine est encore plus active que les Kastellpaolitines et que la phénanthridine.

La figure 4 illustre les résultats de cette comparaison : l'activité de la 6-aminophénanthridine a été déterminée sur boîte et comparée à celle des KP1 et 5 et de la phénanthridine. Pour les quatre molécules, la même quantité est déposée (10 μ l d'une solution à 10 mM). Dans le cas du témoin positif (chlorure de guanidium), la solution utilisée était à 300 mM.

Par conséquent, en greffant ce groupement amino, caractéristique des Kastellpaolitines sur la phénanthridine, on a augmenté fortement l'activité de cette dernière.

Exemple 3 : Synergie entre les produits isolés à l'aide du crible et le chlorure de guanidium

Toutes les molécules actives ont été isolées dans un milieu contenant une faible dose de chlorure de guanidium (200 μ M / dose efficace = 4 mM). Ce parti pris établi lors de la mise au point du crible répondait au souci d'augmenter la sensibilité (et donc le seuil de détection de la méthode). L'effet des molécules dans des milieux contenant plus (500 μ M) de chlorure de guanidium ou n'en contenant pas, a par la suite été observé. La phénanthridine est toujours active sur un milieu sans chlorure de guanidium, mais son activité augmente fortement en fonction de la quantité de chlorure de guanidium

(pourtant en dose nettement sub-efficace) dans le milieu. Ce résultat indique une synergie d'action entre le chlorure de guanidium et la phénanthridine. Le même résultat a été obtenu pour toutes les autres molécules isolées par les inventeurs
 5 (les Kastellpaolitines et la 6-aminophénanthridine).

Exemple 4 : Vérification de la cure en milieu liquide

10

Les inventeurs ont ensuite voulu déterminer si les halos rouges observés dans le test levure correspondaient bien à de la cure du prion [PSI+] et non pas à un artéfact (par exemple ces halos rouges pourraient être dus à une inhibition directe
 15 de la chaîne de biosynthèse de l'adénine par ces molécules, ce qui conduirait à une accumulation de l'AIR). Si ces molécules curent efficacement le prion [PSI+], un traitement en culture liquide de cellules [PSI+] suivi d'un lavage desdites cellules doit leur permettre de former des colonies rouges sur un
 20 milieu gélosé ne contenant plus les molécules. Ces tests ont été réalisés avec la 6-aminophénanthridine sur la souche « strong » sauvage 74-D694.

~~Les conditions de cure en milieu liquide~~ sont les suivantes :
 25 une souche [PSI+] est cultivée pendant 5 jours en milieu liquide en présence des quantités indiquées des différents produits (voir figure 5). Toutes les 24H, une fraction aliquote est lavée en milieu vierge de tout produit et déposée sur un milieu gélosé solide (lui aussi vierge de tout produit)
 30 qui est traité ensuite comme indiqué en figure 2.

Comme montré dans la figure 5, la 6-aminophénanthridine est capable de curer partiellement le prion [PSI+] dans un nombre significatif de cellules. L'efficacité de cure peut être

notablement augmentée en rajoutant une dose sub-efficace (100 μ M) de chlorure de guanidium dans le milieu de culture. Dans une telle cure liquide, le même effet synergique que celui observé dans le test sur boîte est également retrouvé.

5

Exemple 5 : Mise au point et utilisation d'un crible colorimétrique secondaire basé sur l'utilisation de [URE3], un autre prion de levure

10

Un autre test rapide sur boîte a été réalisé, basé sur un autre prion de levure : [URE3]. Ce test constitue un crible secondaire qui permet de généraliser l'effet des produits isolés lors du crible primaire à un autre prion de levure. De la sorte, il est possible d'écarter les molécules actives uniquement contre le prion [PSI+] et donc moins intéressantes car d'un effet non général.

20

Pour le prion [URE3] la souche haploïde utilisée est CC34 (Mat α , *trp1-1*, *ade2-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*, *ura2::HIS3*).

25

La souche NT34 qui a servi pour le crible secondaire a été construite à partir de CC34, souche dans laquelle la phase codante du gène *DAL5* a été remplacée par celle du gène *ADE2* en utilisant la même méthode que celle utilisée pour la construction de la souche STRg6. Pour cela une cassette de délétion correspondant au gène *ADE2* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *DAL5* a été produite par PCR en utilisant de l'ADN génomique de la souche haploïde BY4742 (Mat α , *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *lys2 Δ 0*, *ura3 Δ 0*) comme matrice et les oligonucléotides :

30

ACAACAAAACAAGGATAATCAAATAGTGTAATAAAAAAAAAAATTCAAGATGGATTCTAGAACAG TTGG (SEQ ID N°5) (5'), et,

TATATTCTTCTCTGATAACAATAATGTCAGTGTATCTCACCCTATTATTACTTGTTTTCTA
GATAAGC (SEQ ID N°6) (3') comme amorces.

La mutation *dal5::ADE2* a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche NT34 comme matrice et

5 les oligonucléotides :

ATAGTCTCTGCTCATAG (SEQ ID N°7) (5'), et,

GCTTACAGAAATTCTAC (SEQ ID N°8) (3') comme amorces.

La souche NT34 (*Mat a*, *trp1-1*, *ade2-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*,
ura2::HIS3, *dal5::ADE2*) a été déposée à la CNCM le 10 octobre

10 2002 sous le numéro I-2942.

Ce crible est basé sur le même système colorimétrique que le
crible primaire. Dans la souche de levure NT34, le gène *ADE2*
n'est plus sous contrôle de son propre promoteur, mais sous
15 celui du gène *DAL5*. Lorsque la protéine Ure2p est sous forme
prion ([*URE3*]), la transcription à partir du promoteur du gène
DAL5 est activée donc le gène *ADE2* est exprimé, donc les
souches sont blanches et autotrophes pour l'adénine. Lorsque
la protéine Ure2p est sous forme normale ([*ure3-0*]), la
20 transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est réprimée
donc le gène *ADE2* n'est pas exprimé, donc les souches sont
rouges et auxotrophes pour l'adénine. Lorsque la souche NT34
est traitée avec 5mM de chlorure de guanidium pendant une
dizaine de générations, elle forme des colonies rouges (comme
25 attendu et comme le ferait la souche [*PSI+*] utilisée pour le
criblage primaire). Comme on peut l'observer sur la figure 6,
la phénanthridine et la 6-aminophénanthridine provoquent
l'apparition d'un halo rouge lorsqu'elles sont déposées sur le
petit filtre lui-même déposé sur le tapis de cellules
30 préalablement étalées sur le milieu nutritif gélosé (même
procédé que pour le crible primaire, voir figure 2). Ce
résultat suggère que ces produits sont également actifs sur le
prion [*URE3*]. Il est à noter, toutefois, que ce crible
secondaire est nettement moins sensible que le crible

primaire. Il est donc très utile pour observer rapidement si l'effet des molécules isolées lors du premier crible est généralisable à d'autres prions de levure mais en aucun cas il ne saurait se substituer au crible primaire.

5

Exemple 6 : Vérification de la cure de [URE3] en milieu liquide

Deux types d'expériences ont été menés afin de vérifier que l'effet observé sur boîte avec la souche NT34 correspond bien à de la cure. Tout d'abord, des cellules dans les zones
10 environnant les filtres ont été récupérées pour le témoin négatif (DMSO), positif (chlorure de guanidium) pour la phénanthridine et pour la 6-aminophénanthridine. Ces cellules ont ensuite été striées sur un milieu frais exempt de toutes
15 ces molécules. Les cellules récupérées autour des filtres forment toutes des colonies rouges, à l'exception de celles récoltées autour du témoin négatif. Ce résultat montre que la coloration rouge observée sur boîte pour la souche NT34 correspond bien à une cure et non à un artéfact lié à une
20 inhibition d'une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine (dans ce cas, la coloration rouge serait perdue sur un milieu sans inhibiteur). L'effet de cure de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine a également été vérifié directement sur le prion—[URE3]—. Des cellules [URE3] de la souche CC34
25 poussent sur un milieu appelé USA alors que des cellules curées ([ure3-0]) sont incapables de pousser sur ce milieu. Les inventeurs ont examiné la capacité de cellules [URE3] traitées par 200 μ M de chlorure de guanidium (témoin négatif), par 5 mM de chlorure de guanidium (témoin positif) ou par
30 différentes doses de 6-aminophénanthridine (seule ou en combinaison avec 200 μ M de chlorure de guanidium) à pousser sur un milieu USA. La 6-aminophénanthridine est capable de curer le prion [URE3] de façon significative et, tout comme pour le prion [PSI+], cet effet est accentué par une faible dose de

chlorure de guanidium (200 μ M). Ces résultats, outre le fait qu'ils valident le crible secondaire avec la souche NT34, suggèrent que l'effet des inhibiteurs mis en évidence par ledit crible devrait être général sur tous les prions de levure.

Exemple 7 : Validation du crible avec deux molécules actives sur le prion des mammifères PrP : la chlorpromazine et la quinacrine

10 Le laboratoire de Stanley Prusiner, père de l'hypothèse « protéine seule » et prix Nobel en 1997, a isolé un certain nombre de molécules actives sur le prion de mammifère PrP grâce à un système de cellules murines (neuroblastomes) chroniquement infectées par le prion PrP^{sc} (Korth et al.,
15 2001). Ce système, de par sa lourdeur et sa complexité, ne permet pas un criblage massif comme celui mis au point par les inventeurs. Aussi l'approche du groupe de Stanley Prusiner a-t-elle été de tester une à une, parmi les molécules déjà utilisées comme médicaments, toutes celles qui passent la
20 barrière hémato-encéphalique. Certaines molécules, comme notamment la quinacrine (utilisée comme anti-paludéen depuis longtemps) ou la chlorpromazine (un anti-dépresseur) présentent une activité notable dans leur système. De façon à valider le crible, les inventeurs ont donc testé la
25 chlorpromazine et la quinacrine dans leur système levure. Comme montré dans la figure 7, ces deux molécules présentent une certaine activité contre le prion [PSI⁺]. Il faut toutefois noter que leurs activités sont nettement inférieures à celle de la 6-aminophénanthridine. On peut également relever
30 que la chlorpromazine et la quinacrine, tout comme l'ensemble des molécules mis en évidence par l'invention, présentent une forte synergie d'action avec le chlorure de guanidium (Sur la figure 7, le milieu utilisé contient 200 μ M de chlorure de guanidium). Ce dernier résultat suggère que ces deux molécules

agissent sur la même voie biochimique que les molécules isolées selon l'invention.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la quinacrine, dont l'activité est environ dix fois supérieure à celle de la chlorpromazine dans le test du Pr. Prusiner, présente également une activité nettement supérieure à celle-ci dans le crible mis au point par les inventeurs. En outre, tout comme dans le test du Pr. Prusiner, la chlorpromazine et la quinacrine nécessitent un traitement prolongé (au moins 6 jours dans le cas du test du Pr. Prusiner, au moins deux à trois jours dans le cas du crible selon l'invention) avant de déceler une activité.

Toutes ces corrélations entre l'activité de la quinacrine et de la chlorpromazine selon le test ou le crible utilisé permettent de valider l'utilisation de la méthode selon l'invention pour réaliser des criblages haut débit en vue d'isoler des molécules susceptibles de constituer des médicaments efficaces (sur les mammifères et en particulier sur l'homme) contre des maladies neurodégénératives impliquant des agrégats protéiques, de type encéphalopathies spongiformes, maladies d'Alzheimer, de Huntington...

Références bibliographiques

- 5 Fernandez-Bellot et al., "The protein-only theory and the yeast
Saccharomyces cerevisiae: the prions and the
propagons", CMLS, 2001, 58:1857-1878.
- 10 Korth C. et al., "Acridine and phenothiazine derivatives as
pharmacotherapeutics for prion disease",
PNAS, 2001, 98(17):9836-9841.
- 15 Mettey Y. et al., "Synthesis of 11-Aminodibenzo[b,f][1,4]
thiazepines and Fluoro derivatives", J.
Heterocyclic Chem., 1997, 34:465-467.
- Kessar S.V. et al., Tetrahedron Letters, 1969, 1151.

Revendications

1. Kit de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [*PSI+*] avec un antibiogramme.
2. Kit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène *ERG6* de la souche [*PSI+*] est inactivé.
3. Kit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.
5. Kit selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de curage des prions est le chlorure de guanidium.
6. Méthode de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la levure de phénotype [*PSI+*] et comporte les étapes suivantes :
 - a. réalisation d'un tapis de cellules in vitro
 - b. dépôt des composés à tester selon la méthode de l'antibiogramme,
 - c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
 - d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.
7. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé.
8. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'étape a. comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

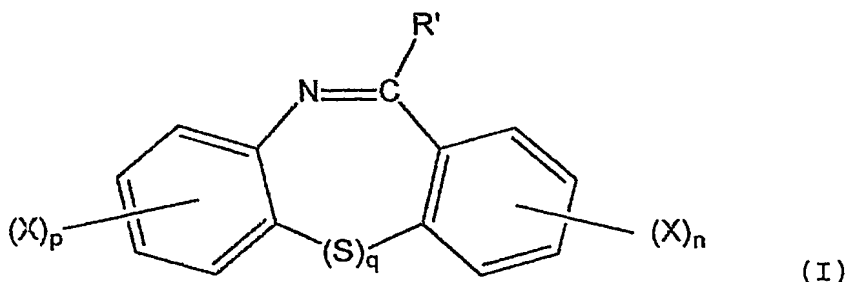
10. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre les étapes suivantes :

- 10 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C, et/ou,
f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

11. Méthode de criblage selon la revendication 10, caractérisée en ce que le test de criblage secondaire comporte les étapes suivantes :

- construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
- réalisation des étapes a. à e. des méthodes selon les revendications 6 et 10, l'étape a. comportant en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

12. Agents anti-prion de formule (I)



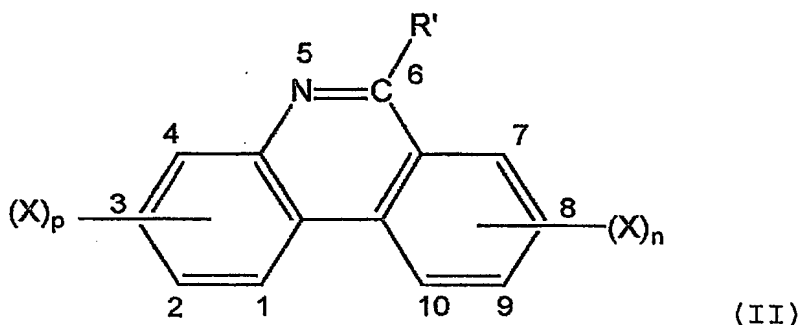
dans laquelle R^1 est un groupement H, NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

5 X représente F, Cl, Br, I, CF_3 , SCH_3 , OCH_3 , OH, NO_2 , $COCH_3$, $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,

10 q égale 0 ou 1.

13. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (II) dans laquelle :



R^1 représente un groupement H, NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F, Cl,

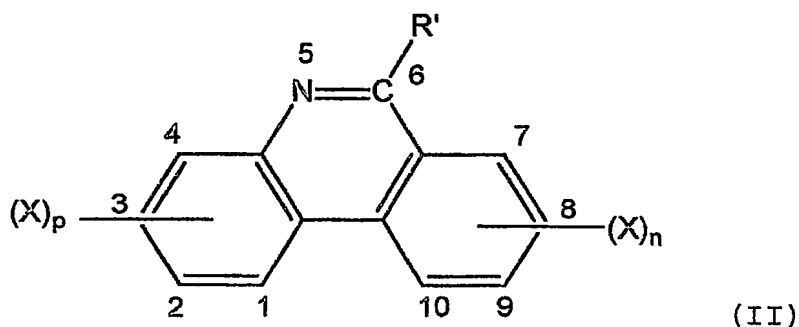
20 p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

14. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (III) dans laquelle :

dans laquelle R' est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SCH_3 , OCH_3 , OH , NO_2 , $COCH_3$, $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones, p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2, q égale 0 ou 1.

13. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (II) dans laquelle :

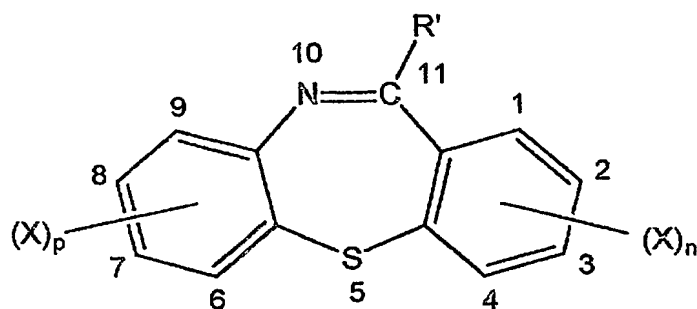


R' représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F , Cl ,

p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

14. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (III) dans laquelle :



(III)

R^1 représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

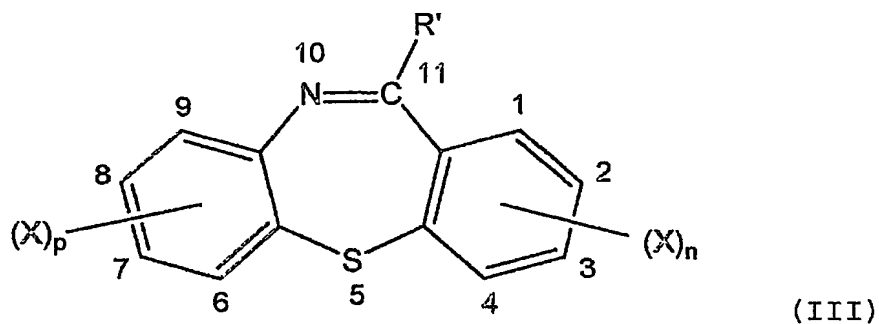
5

X représente F , Cl ,

p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

15. Utilisation des agents anti-prion selon l'une quelconque
10 des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un médicament
destiné à traiter les maladies neurodégénératives impliquant
des agrégats protéiques.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce
15 que les maladies sont les encéphalopathies spongiformes, les
maladies d'Alzheimer et de Huntington.



R' représente un groupement H, NH_2 , $\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$,

5 X représente F, Cl,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

15. Utilisation des agents anti-prion selon l'une quelconque
10 des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives impliquant des agrégats protéiques.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce
15 que les maladies sont les encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer et de Huntington.

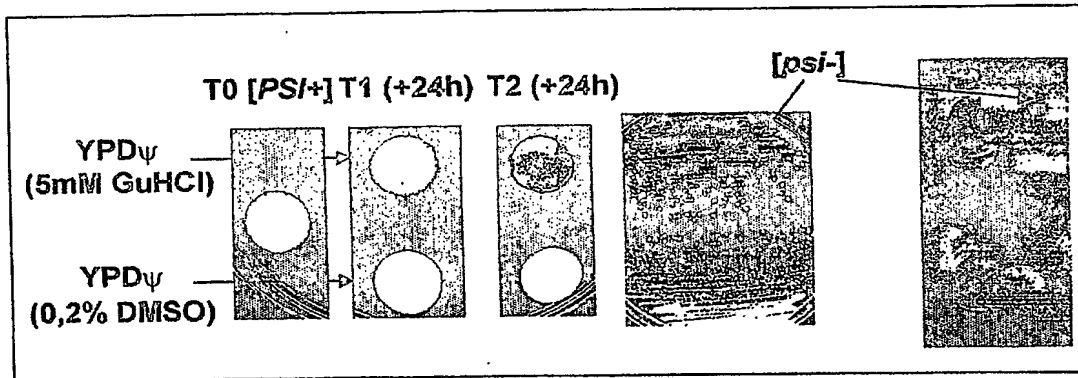


Figure 1

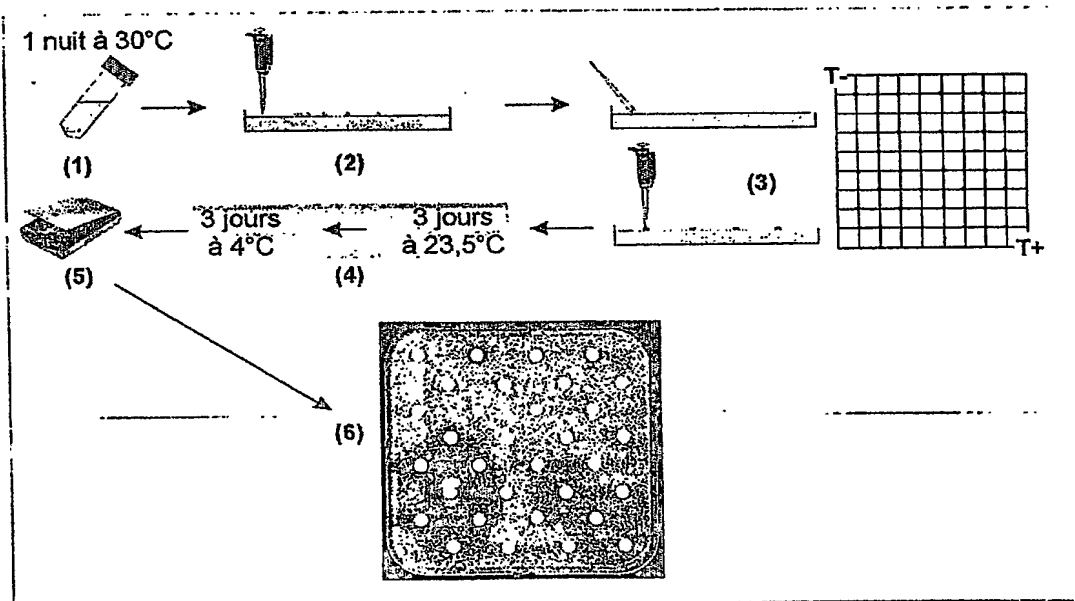


Figure 2

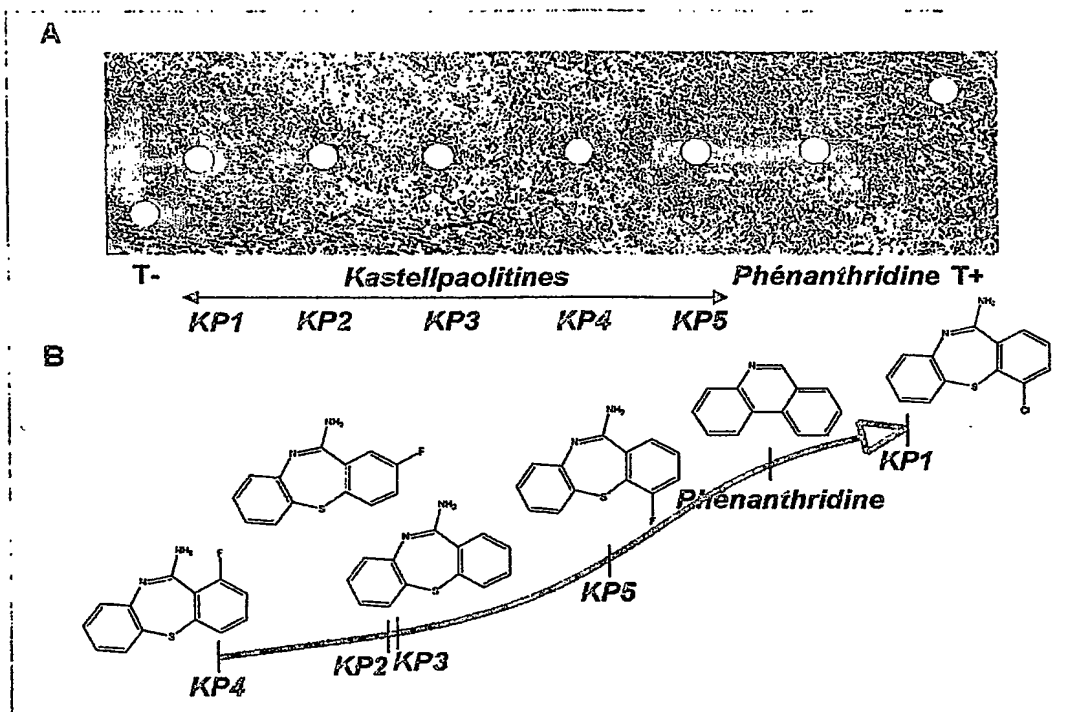


Figure 3

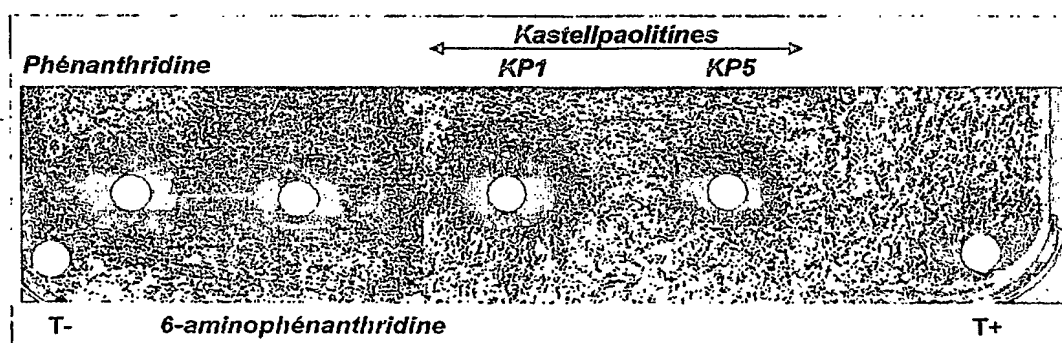


Figure 4

**T-
(100 μ M GuHCl)**

**T+
(4mM GuHCl)**

**100 μ M GuHCl
+ 100 μ M
6-aminophénanthridine**

**100 μ M GuHCl
+ 200 μ M
6-aminophénanthridine**

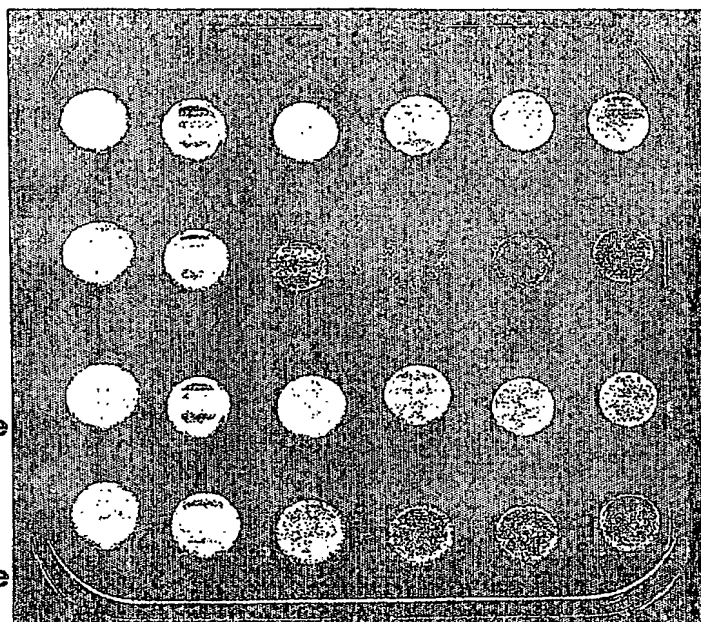


Figure 5

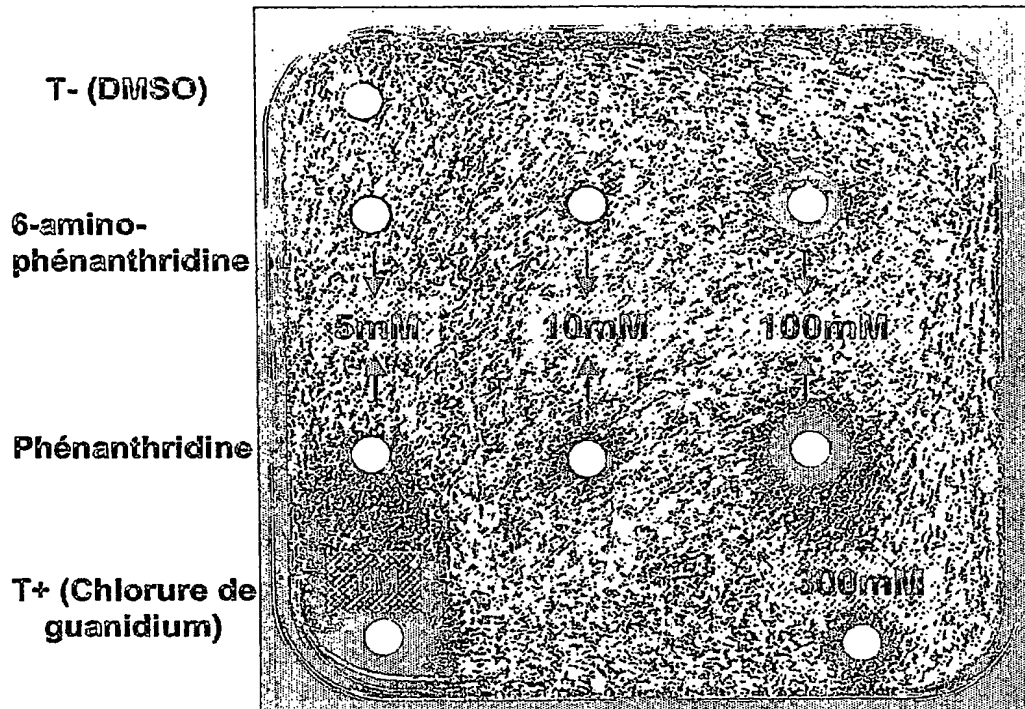


Figure 6

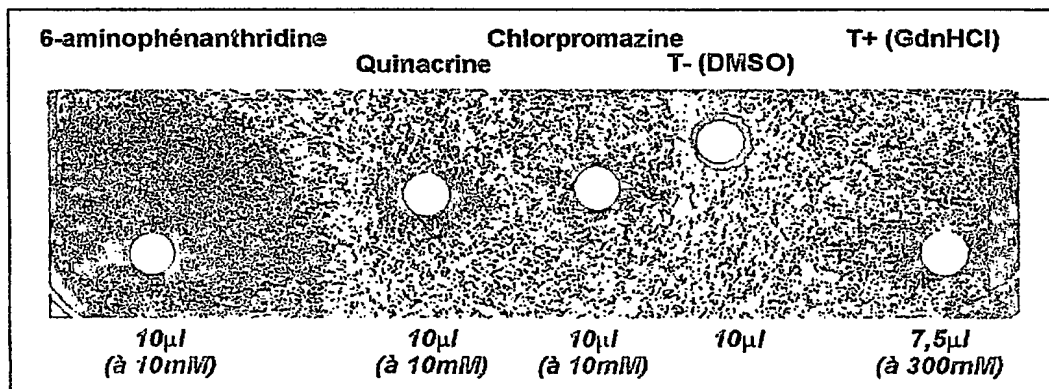


Figure 7

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)

<120> Criblage de molécules à activité anti-prion : kits, méthodes et molécules criblées.

<130> CNRS-1653

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1
cgattttaagt ttacataat ttaaaaaaac aagaataaaa taataatata gtaggcagca 60

taagcggatc cccgggttaa ttaa 84

<210> 2

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2
ctgcatatat aggaaaatag gtatatatcg tgcgctttat ttgaatctta ttgatctagt 60

gaatgaattc gagctcgttt aaac 84

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3
ggtacctcgt tcccgtac 18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4
cagtcagaaa tcgagttcca 20

<210> 5

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5
acaacaaaac aaggataatc aaatagtgta aaaaaaaaaa ttcaagatgg attctagaac 60
agttgg 66

<210> 6

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6
tatattcttc tctgataaca ataatgtcag tgtatctcac cactattatt acttgttttc 60
tagataagc 69

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7
atagtctctg ctcacatag 17

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8
gcttacagaa attctac

17



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (<i>facultatif</i>)		CP/AC 60.806-1653
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 13 022
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
C.N.R.S., UNIVERSITE VICTOR SEGALEN & UNIVERSITE DE POITIERS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	BLONDEL
	Prénoms	Marc
Adresse	Rue	54, rue de la Rive
	Code postal et ville	12 19 2 5 10 SAINT POL DE LEON
Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)		C.N.R.S.
2	Nom	BACH
	Prénoms	Stéphane
Adresse	Rue	3 cité de Kermenguy
	Code postal et ville	12 19 2 5 10 SAINT POL DE LEON
Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)		C.N.R.S.
3	Nom	CULLIN
	Prénoms	Christophe
Adresse	Rue	11 Impasse Vivaldi
	Code postal et ville	13 13 7 0 10 MERIGNAC
Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)		Université Victor Segalen
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Le 18 octobre 2002 Mandataire : Chantal PEAUCELLE n° 92-1189		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CPI/AC 60.806-1653
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 13 022
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
C.N.R.S., UNIVERSITE VICTOR SEGALEN & UNIVERSITE DE POITIERS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	TALAREK
	Prénoms	Nicolas
Adresse	Rue	135 rue Jean Jaurès Apt 23 Res La Malvoisie
	Code postal et ville	3 3 4 0 0 TALENCE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	VIERFOND
	Prénoms	Jean-Michel
Adresse	Rue	2, rue Molière
	Code postal et ville	9 4 7 0 0 MAISONS ALFORT
Société d'appartenance (facultatif)		UNIVERSITE DE POITIERS
3	Nom	METTEY
	Prénoms	Yvette
Adresse	Rue	5, rue de l'ancienne Comédie
	Code postal et ville	8 6 0 0 0 POITIERS
Société d'appartenance (facultatif)		UNIVERSITE DE POITIERS
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Le 18 octobre 2002 Mandataire : Chantal PEAUCELLE n° 92-1189		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.